

Aus der Chirurgischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. L. Schweiberer

Tierexperimentelle Erfahrungen
mit
Glutin als Klebstoff
an
Knochentrepationen

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von
Jutta von Tümpling
aus
Marktoberdorf

1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bedacht

Mitberichterstatter: Prof. Dr. L. Schweiberer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.1.1985

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Fragestellung

Theoretischer Teil

1. Knochenbau
2. Frakturheilung
3. Gewebekleber in der Chirurgie

Experimenteller Teil

Material und Methode

Ergebnisse

Diskussion

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Danksagung

Einleitung und Fragestellung

Gewebeklebstoffe haben in den letzten Jahren großes Interesse in der experimentellen und klinischen Medizin gefunden. Dies kann als Hinweis dafür gelten, daß die herkömmlichen Methoden zur Gewebevereinigung in der Chirurgie nicht immer voll befriedigen. Das trifft im besonderen für die Knochenchirurgie zu. Die Frakturbehandlung berücksichtigt wie schon in den hippokratischen Schriften niedergelegt ist, drei Grundsätze:

1. exakte Reposition des gebrochenen Knochen
2. Fixation zur Erhaltung des Repositionsergebnisses
3. Rehabilitation, d.h. aktive Bewegungsübungen der nicht ruhiggestellten Gelenke und Muskelpartien.

Um diese Forderungen zu erfüllen, werden zahlreiche Verfahren angewendet, die jedoch ihrerseits eine Reihe von Problemen aufwerfen. So findet bei der *R e p o s i t i o n* neben der manuellen Einrichtung die Dauerzugbehandlung und die operative Freilegung mit Reponierung unter Sicht vielfach Anwendung. Gewebefreundliche Metallegierungen und die verschiedenartigsten Platten, Schrauben, Nägel und Spickdrähte wurden im Rahmen der Osteosynthese entwickelt, um möglichst jeder Fraktur gerecht zu werden. Immer wieder aber gibt es Knochenbrüche, für die keines dieser Verfahren in Frage kommt. So können z.B. bei Trümmerfrakturen, wenn die Bruchstücke zu klein sind, Schrauben und Drähte nicht ausreichend fixiert werden. Hier würden sich Gewebeklebstoffe, um einzelne Fragmente miteinander zu verbinden, in geradezu idealer Weise anbieten. Für die *F i x a t i o n* stehen heute folgende drei Methoden zur Verfügung:

1. der von außen schienende Gipsverband
2. die dynamisch ruhigstellende Dauerzugextension
3. die innere, am Knochen selbst angreifende Schiene bei operativer Fixierung.

Der Gipsverband schaltet zwar die am frakturierten Knochen angreifenden Muskelkräfte sicher aus, führt jedoch nicht selten

aufgrund seiner fehlenden Elastizität zu Druckschäden und Durchblutungsstörungen an den Auflageflächen. Mit einem Gewebekleber könnten diese Nachteile vermieden werden. Dieser sollte die Stützfunktion solange übernehmen, bis sich eigenes, belastungsfähiges Knochenmaterial nachgebildet hat, sodaß eine äußere Fixierung wegfiel. Mit Hilfe der Dauerzugextension gelingt immer der Ausgleich einer Verkürzung. Diese Aufgabe wird schwerlich von einem Klebstoff übernommen werden können. Der Vorteil der operativen Frakturbehandlung, z.B. bei Marknagelung langer Röhrenknochen, sind eine bewegungsstabile Fixation, sowie die fehlende postoperative Bewegungseinschränkung. Dafür wird eine ausgedehnte Wundfläche mit der Gefahr einer Infektion geschaffen, und der Nagel muß gewöhnlich in einem zweiten Eingriff wieder entfernt werden. Ein geeigneter Gewebekleber könnte hier das Risiko einer langwierigen posttraumatischen Osteomyelitis und die damit verbundene Gefährdung der Extremität verringern helfen. Bei der R e h a b i l i t a t i o n werden zwar aktive Bewegungsübungen der nicht ruhigzustellenden Gelenke und Muskeln durchgeführt, nicht immer lassen sich aber Nebenerscheinungen wie Inaktivitätsatrophien und Muskelschwund verhindern. Diese Immobilisationsschäden ließen sich mit Hilfe klebetechnischer Verfahren vermeiden, weil der Patient die Fraktur frühzeitig belasten und damit eine rasche Mobilisierung eingeleitet werden könnte. Hieraus würden eine kürzere Krankenhausliegedauer und die frühere Wiederherstellung der Arbeitsfähigkeit resultieren. Folgende Anforderungen sind an einen idealen Knochenklebstoff zu stellen:

- 1.) Starke Klebekraft auch auf feuchter und fettender Gewebegrundlage, da die Oberfläche von nativem Knochen nicht in einen absolut trockenen und fettfreien Zustand zu bringen ist (Schenk, Willenegger).
- 2.) Stütz- und Platzhalterfunktion, bis sich eigenes, belastungsfähiges Knochengewebe nachgebildet hat (Heiss, Contzen).

- 3.) Gute Gewebeverträglichkeit, d.h. keine kanzerogenen Eigenschaften, sowie keine Hemmung der Kallusbildung (Matsumoto, Woodward, Heiss, Gottlob).
- 4.) Biologischer Abbau im Organismus (Gibel, Gumel).
- 5.) Bakterizide und fungizide Eigenschaften (Lemperle und Mit.).
- 6.) Einfache Handhabung (Heiss, Willenegger).

Neben Kunstharzen haben Kollagenpräparate ein breites Anwendungsgebiet in der Medizin gefunden. Sie werden als Hämostatika in Form von Kollagenschaum, sowie in der Gefäßchirurgie zur Herstellung von Gefäßprothesen benutzt. Prof. Bedacht verwendete Kollagen als Füllmaterial in der Knochenhöhle und konnte einen fördernden Einfluß auf die Knochengewebsneubildung nachweisen (Bedacht R.).

Unter seiner Anleitung arbeiteten wir mit zwei Glutinklebstoffen, Kollagenhydratleim und Osseinhydratleim, und prüften diese an Hand der o.g. Forderungen auf ihre Eignung als medizinische Gewebekleber.

Theoretischer Teil

1. Knochenaufbau

Der Knochen ist neben dem Zahnschmelz und dem Zahnbein das härteste Gewebe im menschlichen Körper. Er stellt ein hochspezialisiertes Bindegewebe dar, das durch Einlagerung von Kalksalzen in die organische Grundsubstanz seine Härte erhält. Wir können folgende Bestandteile am Knochengewebe unterscheiden:

Knochenzellen

Kollagenfibrillen

Grundsubstanz

Anorganische Bestandteile

Sämtliche K n o c h e n z e l l e n, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten haben einen gemeinsamen Ursprung, die undifferenzierte Mesenchymzelle (Wallraff). Die Osteoblasten haben eine annähernd kubische Form mit einer Kantenlänge von 15 - 20 μ (Hövels). Sie zeigen die Eigenschaft einer aktiv sezernierenden Zelle: hypertrophischer Golgiapparat, exzentrischer Kern mit Nukleolen, zahlreiche Mitochondrien, cytoplasmatische Einschlüsse und Vakuolen. Die Knochenzellen produzieren Mukopolysaccharide und Kollagenfasern (Sandritter).

Ihr basophiles Cytoplasma ist reich an alkalischer Phosphatase, welcher eine Bedeutung für die Mineralisierung des Knochen zukommt (Fleisch). Sie umkleiden die Knochenbälkchen als kontinuierliche Hülle, sodaß von einer Osteoblastentapete gesprochen werden kann (Vitalli). Die Osteoblasten mauern sich im Laufe der Knochenbildung in der zunächst unverkalkten, später verkalkten Interzellulärsubstanz ein und werden zu Osteozyten. Diese sind spindelförmig und behalten den Mitochondrien- und Enzymbestand der Osteoblasten bei. Die Osteozyten stehen untereinander und mit der Osteoblasten-

tapete durch feine Zytoplasmaausläufer in Verbindung; dadurch werden ihre Ernährung und der Stoffaustausch gewährleistet (Wallraff). Die Osteoklasten stellen mehrkernige Riesenzellen mit acidophilem Cytoplasma dar. Sie liegen in der Osteoblasten-tapete unregelmäßig verstreut. Im Elektronenmikroskop erkennt man an der dem Knochen zugewandten Seite Mikrovilli (Köllickers Bürstensaum), welche die Zelloberfläche um ein Vielfaches vergrößern. Die Funktion der Osteoklasten ist nicht völlig geklärt. Die morphologischen Befunde lassen vermuten, daß sie direkt mit dem Knochenab- und Umbau zu tun haben (Hövels).

Die K o l l a g e n f i b r i l l e n zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Glycin, Prolin, Hydroxyprolin und an polaren Aminosäuren wie Glutamin-, sowie Asparaginsäure, Arginin und Lysin aus (Bowes u. Mit.). Wie bei jedem Eiweißkörper sind 1000 Aminosäuren amidartig zu einer Peptidkette zusammengeschlossen. Diese Primärstruktur enthält alle Informationen für die Entstehung von höheren Strukturen. Drei Peptidketten bilden eine gestreckte Schraube (=Sekundärstruktur). Diese verdrillen sich um eine gemeinsame Achse zur Tripelhelix (=Tertiärstruktur). Sie wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Das ganze Molekül, Tropokollagen genannt, hat eine Länge von 2800 Å, einen Durchmesser von 14 Å und ein Molekulargewicht 360 000 (Karlson).

Markierungsversuche haben gezeigt, daß dieses Makromolekül in den Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten synthetisiert wird. Durch weitere Zusammenlagerung der Tropokollagene, nun im Extrazellulärraum, entsteht die Protofibrille (=Quartärstruktur). Die Kollagenfaser ist ein dichtes Bündel parallelverlaufender Protofibrillen. Es erfolgt anschließend die Verfestigung und die Verringerung der Löslichkeit, d.h. die Reifung des Kollagen (Fleisch).

Das reife Kollagen zeigt eine biologische Halbwertszeit von ca. 100 Tagen, d.h. eine sehr geringe Stoffwechselaktivität (Neuberger u. Mit.). Mit dem Altern des Kollagen, d.h. mit der Zunahme der kovalenten Bindung tritt eine weitere Verfestigung der Fasern auf. Die Altersabhängigkeit ist so streng, daß es gelingt, mit dieser Methode die Altersbestimmung von Ratten durchzuführen (Verzar).

Die kolloidale Masse, welche das Kollagen umgibt, wird **G r u n d s u b s t a n z** genannt. Sie besteht hauptsächlich aus Mukopolysacchariden, die sich aus Chondroitinschwefelsäure und Hyaluronsäure zusammensetzen. Ihre Synthese erfolgt in den Osteoblasten und wird von verschiedenen Hormonen, wie Insulin, somatotropes Hormon und Corticosteroiden gesteuert. Die Mukopolysaccharide beeinflussen die Fasersynthese, den Stoffwechsel zwischen den Zellen und den Verkalkungsvorgang (Vitalli).

Die **a n o r g a n i s c h e n B e s t a n d t e i l e** setzen sich hauptsächlich aus Kalzium-, Phosphat-, Hydroxyl- und Karbonationen, sowie aus Zitrat und Wasser zusammen. In kleineren Mengen kommen noch Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Fluor- und Chlorionen vor. Die wichtigsten Salzverbindungen sind Kalziumkarbonat, Magnesiumphosphat, Kalziumfluorid und Chlorid und Alkalisalze. Die Kristallstruktur der Knochensalze entspricht der von Hydroxylapatiten. Diese lagern sich in der Grundsubstanz und auf den Kollagenfibrillen ab. Der Stoffwechsel der Kristalle ist abhängig von der Homöostase von Calcium- und Phosphationen und der Stabilität des Säure-Basenhaushaltes (Hövels). Man schätzt die Oberfläche und damit die Austauschfläche von 1 g Knochensalz auf 150 - 200 m², was die innere Oberfläche der gesamten Lunge übertreffen würde. Dies bedeutet, daß reger Ionenaustausch mit der interzellulären Flüssigkeit stattfindet. Der Knochen stellt für den ganzen Organismus das größte Ionendepot dar (Bennett).

Er enthält 99% des gesamten Kalzium, 88% des gesamten Phosphat und 80% des Karbonat, 70% des Citrat und 35% des Natrium.

Knochenstruktur

Man kennt zwei Arten von Knochengeweben. Die Unterscheidung erfolgt nach Anordnung der Fibrillen. Der **F a s e r k n o c h e n** oder geflechtartige Knochen besitzt Fibrillenbündel, die wie bei einem derben Bindegewebe angeordnet sind. Man könnte diese Art von Knochengewebe als ein zu Knochen erstarrtes Bindegewebe bezeichnen (Benninghoff). Beim erwachsenen Menschen bleibt diese Knochenform an den Einstrahlungsstellen der Bänder und Sehnen erhalten. Die Fibrillen sind hier parallelfaserig. Der technisch vollkommene Knochen ist der **L a m e l l e n k n o c h e n**. Hier verlaufen die Kollagenfibrillen tangential und zirkulär um die zentral gelegenen Blut-, Lymph- und Nerven Gefäße. Zudem liegt die eine Richtung der Fibrillen annähernd senkrecht auf der vorangehenden, sodaß eine Art Scherengitter entsteht. Durch Ablagerung neuer Lamellen entstehen Lamellensysteme, die einen Kanal, den Haversschen Kanal, mit seinen Blutgefäßen umkreisen. Die Gesamtheit eines Lamellensystem wird ein Osteon oder ein Haverssches System genannt. Kanäle, die nicht von Lamellen umwickelt sind, sondern von außen her die Generallamellen durchbohren und neue Gefäßverbindungen herstellen, werden Volkmannsche Kanäle genannt.

Als äußere Hülle liegt das Periost der Oberfläche des Knochen kontinuierlich an. Hier unterscheidet man zwei Schichten: die innere, blutgefäßreiche Schicht, die während der Zeit des Knochenaufbaues die Osteoblasten enthielt und die äußere Faserschicht. Sharpeysche Fasern ziehen hiervon bogenförmig in den Knochen und stellen somit die Verbindung von Sehnen und Bändern mit dem Knochen her. Durch Foramina nutricia treten

Arterien in die Markhöhle ein, die der Versorgung des Markorgan dienen.

Bei den kurzen Knochen löst sich diese kompakte Anordnung der Knochensubstanz zum Bälkchenwerk der Spongiosa auf. Diese Knochenbälkchen bestehen aus Lamellen, die aneinander gerückt sind, und nicht aus durchlaufenden Systemen. Der Knochen erhält hierdurch ein relativ geringes Gewicht bei ausreichender Festigkeit.

Der Innenraum des Lamellenknochen, des spongiösen Knochen sowie der Haversschen Kanäle wird von dem dünnen osteogenen Endost ausgekleidet.

2. Frakturheilung

Bis zur Einführung der Osteosynthese in die Frakturbehandlung gab es in der Vorstellung des Klinikers nur eine Form von Knochenbruchheilung: die periostale und in geringerem Grade die endostale Kallusbildung. Die Überbrückung des Frakturspaltes erfolgt hier durch einen bindegewebigen und verdickten Kallus (sekundäre Heilung). Schon in den ersten Tagen wachsen Blutgefäße und Fibroblasten in das Frakturhämatom ein und beginnen es zu organisieren (Sandritter). Von der Innenschicht des Periost aus findet am 5. und 6. Tag die Umprägung der Mesenchymzellen zu Knochenzellen statt. Vom 6. Tag an beginnt die Einlagerung von Kalksalzen in die Osteoidmassen (Block). Damit hat die Bildung des vorläufigen knöchernen Kallus begonnen. Dieser sog. Faserknochen wird durch erneuten Umbau (Osteoklasten und Osteoblasten) in der 4. - 6. Woche durch den Lamellenknochen ersetzt. Die Bildung dieses endgültigen knöchernen Kallus ist nach etwa 6 Wochen abgeschlossen.

Unter stabilen Osteosynthesebedingungen ist nun eine Frak-

turheilung bekannt geworden, die dadurch gekennzeichnet ist, daß im Röntgenbild keine, oder fast keine Kallusbildung zur Darstellung kommt. Mit Recht wurde vermutet, daß sich die Heilungsvorgänge hauptsächlich in der Kortikalis abspielen (Willenegger, Perren, Schenk). In Anlehnung an die Wundheilung haben sich die Begriffe der primären und sekundären Knochenheilung für den Fall des Fehlens von Kallusbildung im Röntgenbild, bzw. für sichtbare Kallusbildung, eingebürgert (Bedacht, Willenegger). Willenegger, Schenk und Friedenberg bewiesen 1963 erstmals am Hunderadius die Primärheilung, wobei gleichzeitig erkannt wurde, daß ausschließlich Osteone zu Trägern des Heilvorganges werden. Histomorphologisch werden den bei dieser primären Knochenbruchheilung zwei Formen unterschieden: Kontaktheilung und Spaltheilung (Willenegger u.Mit.) Die Kontaktheilung ist dadurch gekennzeichnet, daß ein direkter Flächenkontakt der Frakturenden vorliegt. An den partiell devitalisierten Fragmentenden kommt es nicht zu formverändernden Resorptionserscheinungen, sondern es erfolgt eine Knochenregeneration über longitudinally gerichtete neue Osteone. Die Bildung dieser Osteone wird durch Osteoklasten eingeleitet, die einen Resorptionskanal "ausbohren", der daraufhin von Osteoblasten besiedelt und mit neuen Knochenlamellen ausgefüllt wird. Auf diese Weise kommt es zu einer gegenseitigen Verzapfung der kortikalen Kontaktflächen durch die Osteone. An Hand von Tetracyclinmarkierungen konnte Schenk für das longitudinale Vorrücken der Kanäle eine Geschwindigkeit von 0,1 mm pro Tag errechnen. Die Form der Spaltheilung wird dort beobachtet, wo ein mikroskopisch kleiner interfragmentärer Spalt vorliegt, wie er sich oft an der plattenfernen Kortikalis findet (Willenegger). Der Heilungsablauf läßt sich in zwei Phasen gliedern: in der ersten Phase sprossen Kapillaren aus dem Periost, dem Endost oder den Haversschen Kanälen der Kompakta in den Spalt ein. Nach Auffüllung des Trennungsspalt es erfolgt in der zweiten Phase die Durchwachsung

mit Osteonen, die ihrerseits aus der Kortikalis, andererseits aus dem Knochengewebe des Spaltes selbst stammen und von hier aus in die Kortikalis einwachsen. Die Revaskularisierung der Frakturende erfolgt sowohl vom unverletzten Periost als auch retrograd vom Spalt aus (Danckwardt, Lillieström u. Mit.). Entsprechend den Untersuchungen von Willenegger konnten diese im Tierversuch gesicherten Befunde auch am menschlichen Knochen bestätigt werden. Kontakt- und Spaltheilung waren nebeneinander an ein und derselben Kortikalis zu finden. Der Osteonbestand war auch am menschlichen Knochen, ähnlich wie am Hunderadius, nach 12 Wochen weit über die Hälfte hinaus erneuert. Jedoch findet sich bei der stabilen Osteosynthese nicht nur eine kortikogene Heilung im Sinne der Kontakt- oder Spaltheilung, sondern es besteht gleichzeitig eine mehr oder weniger geringe periostale und endostale Knochenapposition.

3. Gewebekleber in der Chirurgie

In der klinischen und experimentellen Chirurgie werden heute zwei Gruppen von Gewebeklebern angewandt: synthetische und biologische Klebstoffe. Zu den synthetischen zählen die Abkömmlinge der Vinyl Monomere wie Methyl - 2 - cyanoacrylat (Eastman Monomer 910), Äthyl- 2- cyanoacrylat (Aron Alpha A) und Butyl- 2- cyanoacrylat (Histoacryl N, Histocoll T 100, Fimomed KCL).

In Deutschland hat sich unter dem Namen Palakos ein Methylester-methacrylat in der Orthopädie zur Fixierung von Hüftkopffprothesen bewährt. In den USA wurde ein Polyurethanderivat Ostamer entwickelt, eine Substanz von hohem Molekulargewicht, welche aufgrund ihrer porösen Struktur das Einsproßen von Knochenzellen ermöglicht. In der Schweiz arbeiteten Nigst und Bircher mit dem Epoxyharz Araldit.

Zu den biologischen Klebstoffen rechnen wir diejenigen, die sich teilweise oder gänzlich aus organischen Substanzen zusammensetzen, wie der in den USA entwickelte Gelatine-Resorcin-Formaldehydklebstoff.

Die synthetischen Klebstoffe vereinigen ausgezeichnete Klebekraft, rasche Abbindezeit von max. 45 Sekunden (Contzen), lokale bakterizide Wirkung (Heiss) und relativ einfache Handhabung (Willenegger, Schenk, Heiss). Demgegenüber jedoch stehen die Fragen der Gewebeverträglichkeit und des noch ungeklärten Abbaues im Organismus. Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Polymerisationswärme.

Die Gewebeverträglichkeit der Cyanoacrylate ist abhängig von der chemischen Struktur, der aufgetragenen Menge und von der Klebetechnik (Gibel, Gumel). L. Hullinger (Schweiz) untersuchte an Hand von Leukozyten- und Fibroblastenkulturen die Frage der Histotoxizität von Methylmethacrylat. Im flüssigen Palakosgemisch erweist sich das freie Monomer als äußerst zelltoxisch. Mit Methylcyanoacrylaten ist die histotoxische Schädigung am größten. Diese nimmt jedoch mit höheren Homologen ab. So hat vergleichsweise Butyl-2-cyanoacrylat die beste Gewebeverträglichkeit (Matsumoto, Pani, Gottlob, Heiss).

Doch zeigen auch hier die histopathologischen Untersuchungen nekrobiotische Bezirke und granulomatöse Fremdkörperreaktionen mit Riesenzellen (Turner, Mandarino, Gibel, Gumel).

Ostamer ist nach 20 Minuten mit dem Knochen fest verbunden und belastungsfähig, hindert jedoch nachweislich die endostale und exostale Kallusbildung (Nigst u.Mit.). Die Ergebnisse mit Araldit weisen nach 6 Wochen Ermüdungsbrüche auf.

Beim Berühren des Klebestoffes mit der Wundfläche entstehen aus niedermolekularen organischen Verbindungen Makromoleküle; es bildet sich hierbei eine feste Substanz. Die dabei freigesetzte Polymerisationswärme übersteigt weit den Koagulationspunkt des Eiweiß von 56°C (Lenartz). Für Palakos liegt sie zwischen 90°C (Carstensen) und 108°C (Hupfauer u.Mit.). Sie

ist verantwortlich für die Bildung von Fremdkörpern und Thermonekrosen im Gewebe (Gibel, Gumel).

Der biologische Zweikomponentenkleber, bestehend aus einer Gelatine- Resorcinmischung, welche auf Zusatz von Formaldehyd vernetzt wird, wurde von Lemperle, Köhnlein u.Mit. experimentell untersucht. Seine Haftfähigkeit sei, besonders auf feuchter Grundlage, verglichen mit den Cyanoacrylaten, mindestens ebenso gut; die Abbindezeit beträgt 30 Sekunden. Die Polymerisationswärme ist nahezu unerheblich. Als Phenolabkömmling hat Resorcin fungizide und bakterizide Wirkung. Die Anwendung dagegen ist umständlich, da die Gelatine- Resorcinlösung zunächst auf 40°C erwärmt werden muß, um ihre hohe Viskosität zu senken, sodann werden die Wundränder mit Formalin bestrichen, die Wundflächen adaptiert und schließlich das Gelatine- Resorcingemisch beiderseits dünn auftragen. Die Anwendung besteht folglich aus drei Arbeitsgängen. Die histologischen Ergebnisse nach GRF- Klebungen zeigen, im Gegensatz zu den Cyanoacrylaten, nur geringe zelluläre und exsudative Reaktionen. Keine Fremdkörperriesenzellen, keine Nekrosebildungen. Der Abbau, welcher über Phagozytose erfolgt, liegt zwischen zwei Wochen und drei Monaten.

Über den Mechanismus des Abbaus der Cyanoacrylate im Organismus gibt es vorerst nur Hypothesen. Es wird eine Spaltung durch Esterasen diskutiert (Heiss, Gottlob). Der Abbau erfolgt relativ langsam. In einzelnen Fällen konnte der im Gewebe verbliebene Klebstoff noch nach einem Jahr nachgewiesen werden (Pani, Lemperle, Köhnlein). Die Markierung mit C_{14} zeigt, daß die Ausscheidungsgeschwindigkeit für Methacrylat am größten ist und mit Zunahme der Alkylgruppe abnimmt. Nach Untersuchungen von Gottlob geht die Geschwindigkeit des Abbaus parallel mit der Histotoxizität. Auch hier besitzt Methyl-2-cyanoacrylat mit der kürzesten Resorptionszeit die höchste Toxizität.

Über mögliche krebserregende Wirkung der Acrylate wird dis-

kutiert. Grundsätzlich sind alle Stoffe mit einer aktiven Alkylgruppe suspekt. Zwei Arten von Malignomen sind denkbar, die durch Cyanoacrylate oder andere Klebstoffe verursacht werden könnten: Fremdkörpersarkome und Tumoren durch chemische Kanzerogenität. Voraussetzung für die Sarkombildung sind Form und Größe des Fremdkörpers, sowie Verweildauer im Organismus. Page u. Mit. untersuchten, ob Methyl-2-cyanoacrylatklebstoff nach subkutaner Injektion an Ratten Fremdkörpersarkome auslösen kann. Sie beobachteten in einem Fall an der Injektionsstelle herdförmige anaplastische Proliferationen, bei anderen Tieren das Auftreten von Tumoren am Injektionsort mit Lungenmetastasen, außerdem die gelegentliche Bildung von Spontantumoren in allen Versuchsgruppen. Andere Autoren (Matsumoto u. Mit., Heiss) fanden bei Ratten, Mäusen und Hunden nach Anweisung von Butyl-2-cyanoklebstoffen keinen Hinweis für Fremdkörpersarkome. Klinische Beobachtungen von Ott machen es wahrscheinlich, daß auch beim Menschen Fremdkörpersarkome entstehen können. Der endgültige Beweis hierfür steht noch aus. Vorläufig kann nur gesagt werden, daß durch die gute Resorbierbarkeit der Acrylatklebstoffe das Risiko für eine Fremdkörpersarkombildung geringer ist als bei nicht resorbierbarem Implantationsmaterial.

Experimenteller Teil

Material

Definition

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Klebstoffe gehören zu den biologischen Gewebeklebern. Glutin ist die Sammelbezeichnung für Eiweiß der Gelatine, welche durch die Aufbereitung von tierischer Haut und Knochen gewonnen werden. Der von uns verwendete Kollagenhydratleim wird aus Rinderhaut, der Osseinhhydratleim aus Rinderknochen gewonnen.

Herstellung

Es soll kurz auf die technische Herstellung von Glutinen eingegangen werden. Die chemische Aufbereitung von tierischer H a u t beginnt mit dem Herauslösen von Haaren und Fleischresten sowie der Fettverseifung durch Behandlung mit Kalkmilch. Diese wird anschließend ausgewaschen und die gequollene glasig erscheinende Haut mittels Naßdampf erhitzt. Bei diesem Prozeß bildet sich aus dem Kollagen das Kollagenhydrat. Die so erhaltene Glutinlösung wird filtriert, neutralisiert, gebleicht und für gewöhnlich mit Konservierungsmitteln versetzt. Um eine eventuelle Toxizität auszuschließen, wurde bei der Herstellung des vorliegenden Glutins auf Konservierungsmittel verzichtet. Nach dem Eindampfen im Vakuum erstarrt das so konzentrierte Kollagen-glutin in Blöcken. Diese kommen in pulverisierter Form zum Versand.

Auf die Säuberung und Zerkleinerung tierischer K n o c h e n folgt die Entfettung durch Extraktion mit Benzin oder Tri-

chloräthylen. Um die Hitzedenaturierung des Eiweiß zu vermeiden, wird die Extraktionstemperatur zwischen dem Koagulationspunkt des Knochenalbumin und dem Siedepunkt des Fettes, d.h. zwischen 32°C und 80°C gehalten.

Die entfetteten Knochen werden zur Herauslösung des Kalziumphosphats in verdünnter Salzsäure gelagert. Anschließend bleicht man den Knorpelrückstand mit 0,5 - 1%iger schwefliger Säure. Die Knorpelsubstanz wird mittels Naßdampf erhitzt, wobei das Ossein zu Osseinhydrat aufgelöst wird. Nach dem Eindampfen im Vakuum läßt man die Trockensubstanz in kaltes Toluol eintropfen, wodurch ihr ein Großteil des Restwassers entzogen wird. Durch dieses Eintropfen erhält das Osseinglutin sein typisches perlartiges Aussehen.

Chemische und physikalische Eigenschaften

Kollagenhydrat und Osseinhydrat unterscheiden sich chemisch nur wenig voneinander; beides sind hochmolekulare Eiweißstoffe, von einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 350.000. Sie bestehen beide aus komplexen Prolinketten mit Glycin, Prolin und Hydroxyprolin als den hauptsächlichsten Aminosäuren. Der Stickstoffgehalt beträgt für beide 14 - 16%. Sie enthalten beide Spuren schwefliger Säure, ebenso ist der Wassergehalt von 17% für beide Präparate gleich.

Sie unterscheiden sich durch einen höheren Kalzium- bzw. Aschegehalt im Kollagenhydrat und einen größeren Chlorid-Ionenanteil im Osseinhydrat. Der p_H -Wert beträgt für Kollagenhydrat 6,1, für Osseinhydrat 7,0. Außerdem werden sie durch klebtechnische Kriterien wie Viskosität und Gallertfestigkeit, definiert: für Kollagenhydrat beträgt die Viskosität 44 mP (=Millipoise), für Osseinhydrat 43 mP (absolute Viskosität nach Poiseuille). Die Gallertfestigkeit wird in bloomgramm (bg) gemessen. Kollagenhydrat hat eine Gallertfestigkeit von 173 bg, Osseinhydrat von 261 bg.

(Ein Bloomgramm ist die Kraft, die erforderlich ist, um einen Ebonitstempel von 12,7 mm Durchmesser und ebener Unterfläche

in eine Gallerte des zu prüfenden Leims 4 mm tief einzudrücken). Kollagenhydrat bildet ein geruchloses, gelbes Pulver. Osseinhydrat, ebenfalls geruchlos, stellt sich als eine bernsteinfarbene, perlartige Substanz dar. (s. Tab. 1).

Handhabung

Beide Glutinleime müssen vor Gebrauch folgendermaßen zubereitet werden:

10 g des Klebestoffs werden in einem Becherglas mit 12 g Aqua.dest. überschichtet, dem zuvor drei Tropfen Glycerin zugesetzt wurden. Diese Mischung läßt man 15 Minuten bei Zimmertemperatur quellen. Sodann wird sie in einem Wasserbad erwärmt und eine Stunde lang auf 60°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 38°C ist sie verarbeitbar und besitzt bei dieser Temperatur eine offene Zeit (=Abbindezeit) von 1 Minute. Die Abbindezeit ist die Zeit, in welcher der Leim als hochvisköse Flüssigkeit mit einem Spatel o.ä. verarbeitbar ist. Nach dieser Frist tritt Filmbildung ein und damit Verhärtung.

Beide Klebstoffe sind bis maximal 33°C gerade noch verarbeitbar. Allerdings ist dann die offene Zeit wesentlich kürzer. Es empfiehlt sich, von dem Gesamtvorrat immer nur die gerade benötigte Menge herauszunehmen und die Restmenge bei etwas höherer Temperatur, z.B. bei 40 - 45°C, im Wasserbad zu halten.

Tab. 1 : Chemische und physikalische Unterschiede
zwischen Kollagenglutin und Osseinglutin

	Kollagenglutin	Osseinglutin
p _H	6,1	7,0
Asche- und Sulfitgehalt	1,7 %	kleiner als 0,1 %
Viskosität	44 mP	43 mP
Gallert- festigkeit	173 bg	261 bg

mP = Millipoise

bg = bloomgramm

Methode

Als Versuchstiere dienten 28 erwachsene, im Durchschnitt 3,7 kg (3,1 - 4,4 kg) schwere Kaninchen beiderlei Geschlechts. Die Narkose wurde mit Pentobarbital-Natrium (1 ml pro kg Körpergewicht) durchgeführt. Sodann wurde an der Vorderseite des rechten Tibiaschaftes, unterhalb der tuberositas tibiae, unter aseptischen Kautelen, ein Hautschnitt von 2 cm Länge angelegt und die Weichteile, sowie das Periost stumpf zur Seite geschoben, sodaß der Knochen frei zugänglich war. Mit einer Rotationssäge wurde ein ca. 8 x 3 mm großes rechteckiges Knochensegment bis zur Markhöhle ausgesägt. Dieses wurde abgehoben und in steriler Kochsalzlösung aufbewahrt. Die Markhöhle ist mit sterilen Tupfern ausgeräumt und weitgehend trockengehalten worden. Bei einer Gruppe von 10 Tieren wurde mit einem Spatula 1 ml Kollagenglutin, bei einer weiteren Gruppe von 10 Tieren wurde 1 ml Osseinglutin eingetragen. Die Kanten des ausgesägten Knochenfensters wurde ebenfalls mit Klebstoff bestrichen und dieses wieder reponiert. Bei 8 Kontrolltieren wurde die Osteotomie auf die gleiche Weise durchgeführt, das ausgesägte Knochensegment jedoch ohne Glutin nach Ausräumung der Markhöhle wieder eingesetzt. Nach schichtweisem Wundverschluß wurde die Wunde mit neomycinhaltigem Puder bestreut und mit einem sterilen Unterschenkelverband abgedeckt. Anschließend ist jedem Tier zur Infektionsprophylaxe 1 ml Doxycyclin i.v. verabreicht worden.

Um die Kallusbildung in Intervallen zu erfassen, wurde bei jeder Gruppe die Versuchszeit nach sechs Wochen und nach neun Wochen beendet. Es wurde die Tibia von den Weichteilen befreit und, nach einer makroskopischen Beurteilung, röntgenologisch befundet.

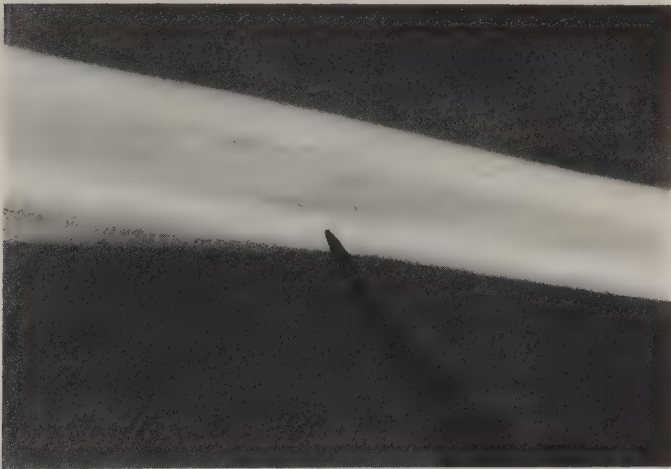
Außerdem wurden bakteriologische und histologische Untersuchungen angestellt. Hierfür wurde zunächst jedes Präparat im Operationsbereich osteotomiert und aus der Markhöhle ein Abstrich entnommen. Das Wachstum von Keimen sowie Sporenbildung wurde auf festen Nährboden (Fleisch-Wasser-Pepton-Bouillon) nach 48-stündiger Bebrütung abgelesen. Zur histologischen Auswertung wurden von jedem Situs, ebenfalls im Operationsgebiet, zwei Knochenschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin, bzw. van Gieson angefärbt. Intraoperativ wurden von Kollagenglutin und Osseinglutin die Abbindezeit und die Haftfähigkeit geprüft.

Schließlich wurden Haftfähigkeit und Handhabung der Glutinklebstoffe beurteilt.

Ergebnisse

Versuchsreihe mit Kollagenglutin

Bei der makroskopischen Untersuchung zeigen die fünf Präparate nach 6 Wochen eine glatte, unauffällige Einheilung des ausgesägten Knochensegmentes. Röntgenologisch sind nach dieser Zeit die Längsseiten der ausgesägten Knochenfenster als schmale Aufhellungen zu erkennen, die übrigen Konturen sind durch Kallusbrücken mit der Umgebung verwachsen (s. Abb. 1).

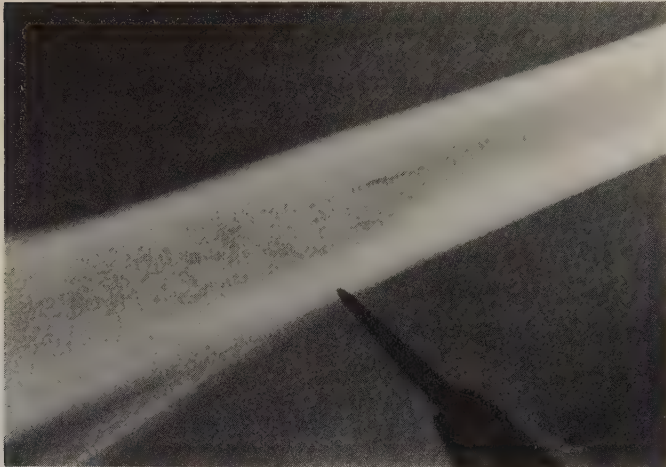


8x

Abb. 1

Nach 9 Wochen Untersuchungszeit zeigen makroskopisch drei Präparate ebenfalls eine reizlose Einheilung. Bei einem Präparat ist der Knochendeckel schräg eingewachsen und der Osteotomiespalt an einer Seite erkennbar. Bei einem weiteren Präparat liegt das ausgesägte Knochenfenster locker im Rahmen; es finden sich keine Anzeichen eines knöchernen Einbaus.

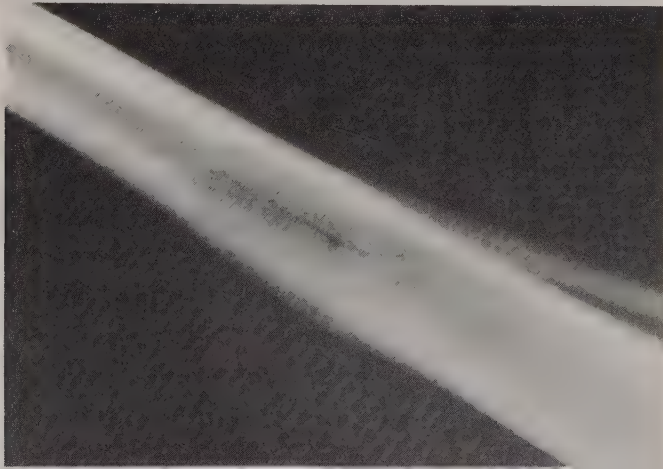
Röntnologisch zeigt von fünf Präparaten eines einen abgeschlossenen knöchernen Einbau. Das Knochenfenster ist reizlos eingehellt und nur schwer von der übrigen Umgebung zu unterscheiden (s. Abb. 2).



8x

Abb. 2

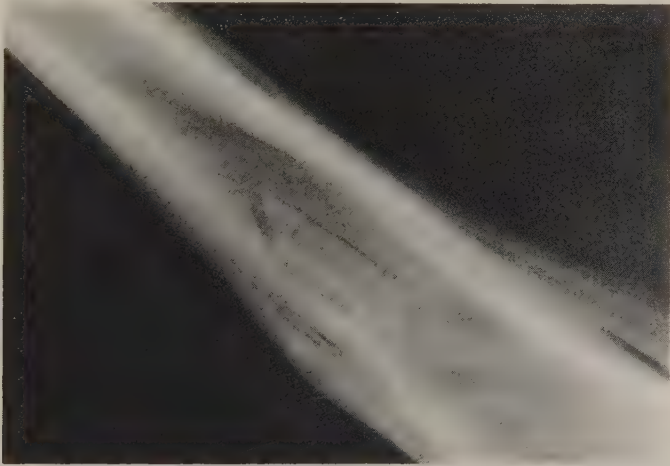
Zwei weitere Präparate zeigen auf zwei Seiten gute Kallusbildung, die Längsseiten sind jedoch jeweils noch als zarte Aufhellungen zu erkennen, sodaß von einem fortgeschrittenen knöchernen Umbau gesprochen werden kann. Das Präparat mit dem schräg eingewachsenen Segment weist im Röntgenbild eine aufgelockerte und poröse Struktur der Kortikalis im Operationsbereich auf (s. Abb. 3).



8x

Abb. 3

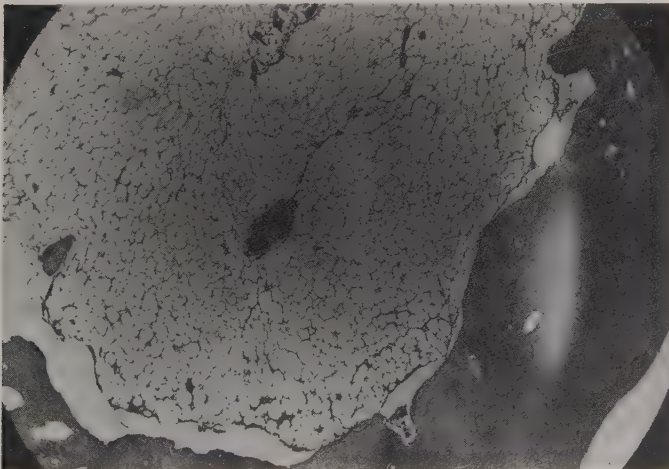
Keine Anzeichen eines knöchernen Einbaus sind auf der Aufnahme des letzten Präparates zu finden, was dem makroskopischen Befund des locker aufliegenden Knochenfensters entspricht. Außerdem fällt hier eine bis auf das Doppelte verdickte Kortikalis im Operationsgebiet auf (s. Abb. 4).



8x

Abb. 4

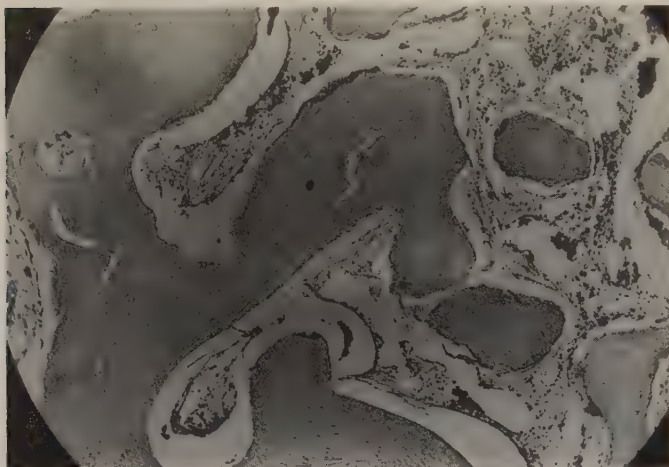
Histologisch weisen die fünf Präparate, die nach 6 Wochen untersucht wurden, durchweg eine vom Endost ausgehende, rege Knochenneubildung auf. In der Markhöhle hat sich reichlich Granulationsgewebe gebildet, in welchem zahlreiche neugebildete Knochenbälkchen mit gut ausgebildeten Osteoblastensäumen liegen (s. Abb. 5).



50x

Abb. 5

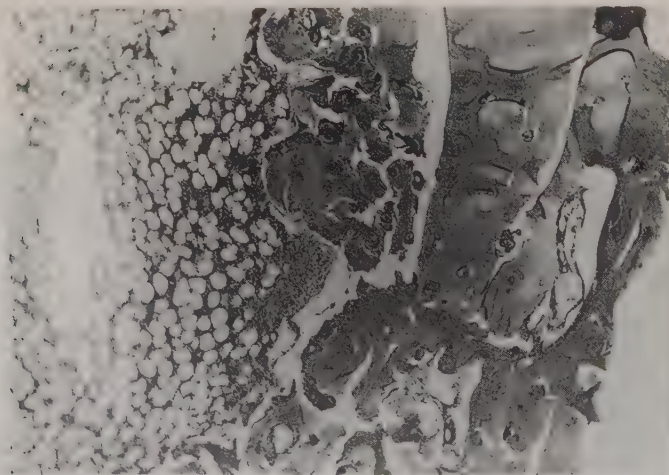
Nach 9 Wochen zeigen drei Präparate histologisch ebenfalls das Stadium lebhafter Knochenbildung, die teils vom Endost, teils vom Periost ihren Ausgang nimmt (s. Abb. 6).



320 x

Abb. 6

Das Präparat mit dem schräg eingewachsenen Segment weist eine herabgesetzte Osteoidbildung mit verminderter Anzahl von Osteoblasten und einer Rarefizierung der Spongiosa im Sinne einer Osteoporose auf (s. Abb. 7).



50 x

Abb. 7

Beim letzten Präparat wird der Defekt ausschließlich mit Granulationsgewebe ausgefüllt. In keinem histologischen Schnitt können Fremdkörperreaktionen mit vielkernigen Riesenzellen nachgewiesen werden. Reste von Kollagen-glutin sind nicht vorhanden.

Die bakteriologischen Abstriche aus der Markhöhle bringen nach 48- stündiger Bebrütung in keinem Fall ein pathologisches Wachstum.

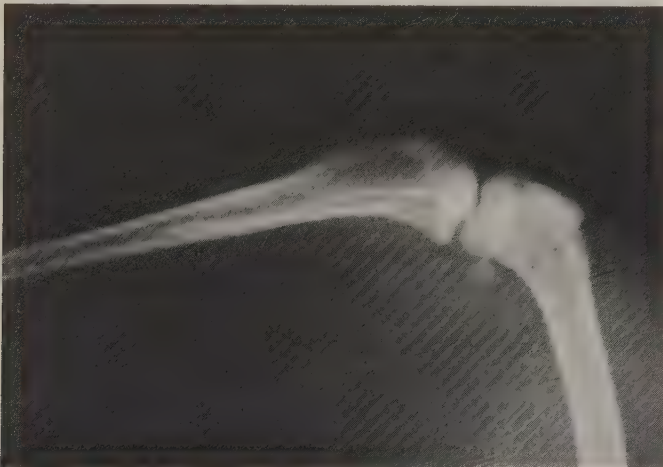
Die Abbindezeit für Kollagenglutin beträgt 50 Sekunden. In dieser Zeit ist der Klebstoff eine Verbindung mit dem umliegenden Gewebe eingegangen. Intraoperativ konnte eine Haftung des ausgesägten Knochensegmentes beobachtet werden, die umso stärker war, je trockener die anliegenden Knochenteile gehalten werden konnten (s. Tab. 2).

Tab. 2: Ergebnisse mit Kollagenglutin

	nach 6 Wochen	nach 9 Wochen
Rö. Befund	Anzahl: 1-5 beginnende endost. Kal- lusbildung	Anzahl: 1 abgeschlossene Kallusbildung 2 fortgeschrittene Kallusbildung 1 Osteoporose 1 keine Kallusbil- dung
Hist. Befund	Anzahl: 1-5 keine Fremd- körperreaktion	Anzahl: 1-3 ausreichende Kal- lusbildung 1 Osteoporose 1 keine Knochenneu- bildung
Bakt. Untersuchg.	Anzahl: 1-5 kein Keimwachs- tum	Anzahl: 1-5 kein Keimwachs- tum
Abbindezeit	50 Sekunden	

Versuchsreihe mit Osseinglutin

Nach 6 Wochen stellt sich die tibia von vier Präparaten äußerlich glatt und unauffällig dar. Das fünfte Präparat ist im Osteotomiebereich frakuriert. Röntgenologisch zeigen die Schmalseiten der Knochenfenster schwach skizzierte Aufhellungen, so daß von einer fortgeschrittenen periostalen und endostalen Kallusbildung gesprochen werden kann (s. Abb. 8).

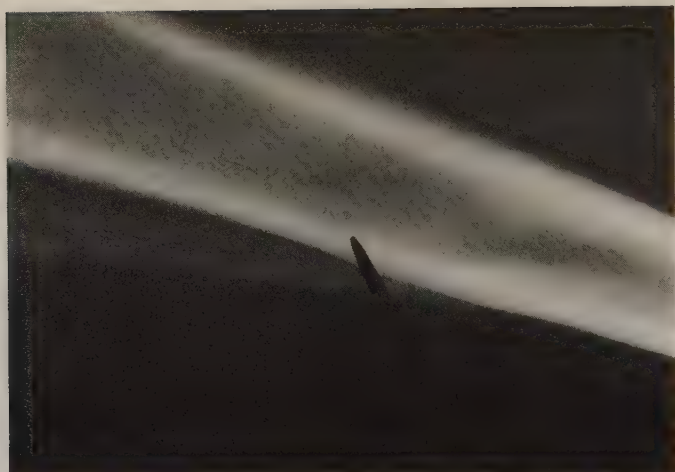


2 x

Abb. 8

Ein Präparat weist, entsprechend dem makroskopischen Befund, eine Querfraktur im Operationsbereich mit Stauchung der gebrochenen Teile auf.

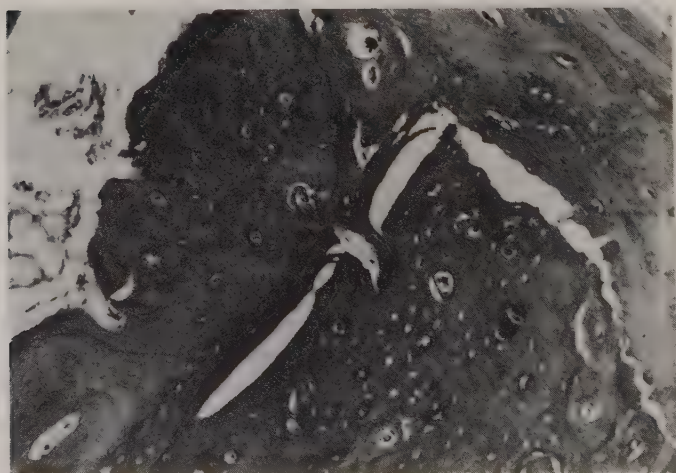
Nach 9 Wochen Beobachtungszeit finden wir die Knochensegmente der fünf Untersuchungstiere makroskopisch zufriedenstellend eingeeilt. Sie sind fast nahtlos mit dem umgebenden Knochengewebe verwachsen. Im Röntgenbild zeigen sämtliche fünf Präparate einen abgeschlossenen knöchernen Einbau. Die Knochenfenster sind durch kräftige Kallusbrücken eingeeilt. Aufhellungen sind an keiner Seite mehr erkennbar (s. Abb. 9).



8 x

Abb. 9

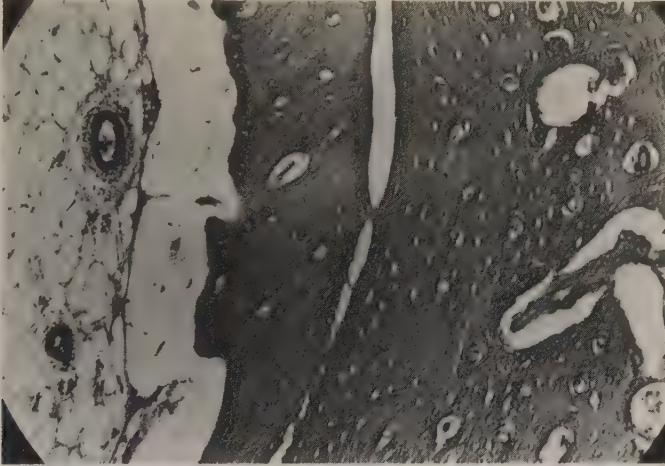
Bei der histologischen Untersuchung finden sich nach sechs Wochen entsprechend dem röntgenologischen Befund bei den vier Präparaten zahlreiche neue Knochenbälkchen mit gut ausgebildeten Osteblastensäumen. Der Markraum enthält reichlich Granulationsgewebe (s. Abb. 10).



320 x

Abb. 10

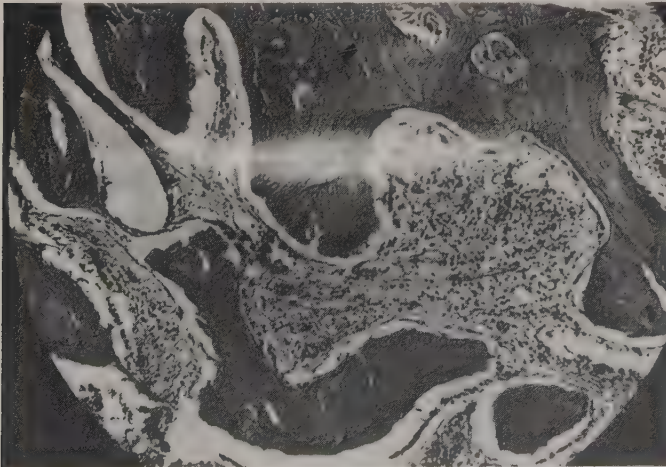
Nach neun Wochen ist bei vier histologischen Schnitten ebenfalls ein vollständiger Knocheneinbau zu erkennen. Über Periostvernarbung, sowie über endostale Kallusbildung ist der Osteotomiespalt geschlossen (s. Abb. 11).



320 x

Abb. 11

In einem Fall finden sich Rundzellinfiltrate als Zeichen einer abgelaufenen Entzündung. Man sieht lymphozytär-plasmazellulär infiltriertes Narbengewebe, jedoch keine Fremdkörperriesenzellen. Osseinglutin ist nicht nachweisbar (s. Abb. 12).



125 x

Abb. 12

Die bakteriologischen Abstriche aus der Markhöhle sind bis auf ein Präparat steril. Bei diesem wurden aus der Bouillon zahlreiche Sporenbildner gezüchtet.

Die Abbindezeit für Osseinglutin beträgt 90 Sekunden.

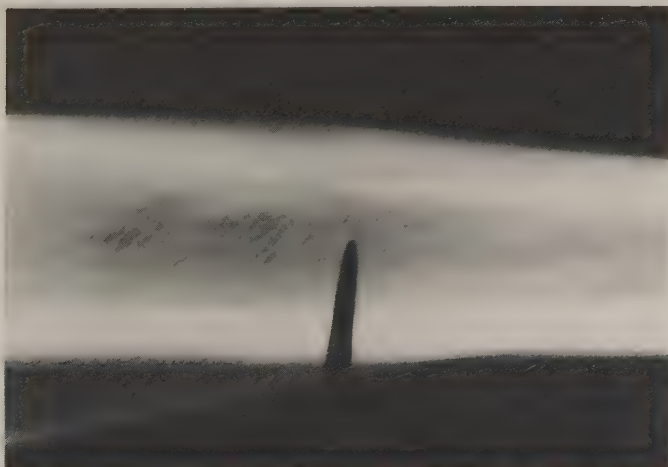
Die Adhäsionskraft nach dieser Frist ist wesentlich abhängig vom Fett- und Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung (s. Tab. 3).

Tab. 3: Ergebnisse mit Osseinglutin

	nach 6 Wochen	nach 9 Wochen
Rö.Befund	Anzahl: 1-4 fortgeschrittene Kallusbildung 1 Fraktur	Anzahl: 1-5 abgeschlossene Kallusbildung
Hist.Befund	Anzahl: 1-5 keine Fremdkörperreaktion	Anzahl: 1-4 keine Fremdkörperreaktion 1 Rundzellinfiltrat
Bakt. Untersuchung	Anzahl: 1-5 kein Keimwachstum	Anzahl: 1-4 kein Keimwachstum 1 Sporenbildner
Abbindezeit	90 Sekunden	

Ergebnisse der Kontrollreihe

Innerhalb der Kontrollreihe ist nach 6 Wochen ein Knochen-segment reizlos eingeheilt; zwei weitere sind im Operations-bereich frakturiert; ein Kontrolltier ist nach zehn Tagen ge-storben. Röntgenologisch weist ein Präperat fortgeschrittene periostale und endostale Kallusbildung auf (s. Abb. 13).



8 x

Abb. 13

Das dritte und vierte Präparat weist im Operationsbereich eine Querfraktur, bzw. eine Schrägfraktur auf. Das während der Untersuchungszeit verstorbene Kontrolltier zeigt keinerlei knöchernen Einbau.

Nach 9 Wochen haben wir von vier Präparaten zwei makrosko-pisch befriedigende Einheilungen zu verzeichnen; die rest-lichen zwei sind wiederum frakturiert. Röntgenologisch sind bei zwei Präparaten keine Aufhellungen mehr im Osteotomie-bereich zu erkennen. Die periostale Knochenneubildung ist somit abgeschlossen (s. Abb. 14).



0,5 x

Abb. 14

Zwei Präparate weisen, entsprechend dem makroskopischen Befund, zwei Querfrakturen auf, die in einem Fall durch reaktive Kallusbildung überbrückt wird, im anderen Fall findet sich eine Dislokation mit Absprengung des Knochen-
deckels.

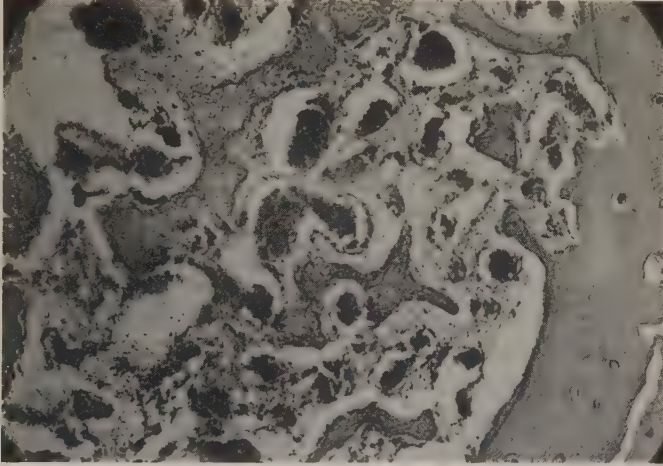
Die histologischen Schnitte zeigen nach 6 Wochen bei einem Präparat eine reaktive Knochenneubildung. Neben neugebildeten Knochenbälkchen findet sich fettzellreiches Granulationsgewebe (s. Abb. 15).



125 x

Abb.

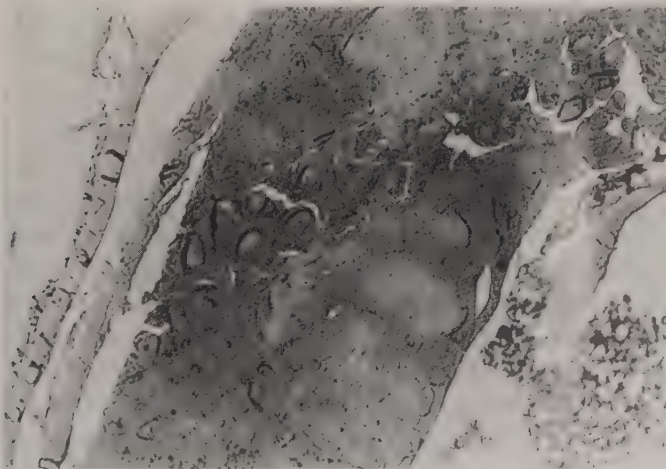
Auf dem Präparat des verstorbenen Tieres erkennt man zusätzlich eine diffuse osteogene Metaplasie, sowie eine ausgeprägte Markfibrose. Außerdem finden sich zahlreiche Lymphozyten und Plasmazellen als Zeichen einer chronischen Entzündung (s. Abb. 16).



125 x

Abb. 16

Nach 9 Wochen sieht man im Markraum von zwei Präparaten reichlich Granulationsgewebe, keine Entzündungszeichen. Die Knochendeckel sind durch üppige Kallusbildung eingebaut, die bei einem Präparat zur Verdickung einer Segmentseite geführt hat (s. Abb. 17).



50 x

Abb. 17

Die bakteriologischen Abstriche aus der Markhöhle ergeben in keinem Fall ein pathologisches Wachstum (s. Tab. 4).

Tab. 4: Ergebnisse der Kontrollreihe

	nach 6 Wochen	nach 9 Wochen
Rö.Befund	Anzahl:	Anzahl:
	1 fortgeschrittene Kallusbildung	2 abgeschlossene Kallusbildung
	2 Frakturen	2 Frakturen
	1 kein knöcherner Einbau	
Hist. Befund	Anzahl:	Anzahl:
	1-3 keine Fremdkörperreaktion	1-4 keine Fremdkörperreaktion
	1 osteogene Metaplasie	
Bakt. Untersuchg.	Anzahl:	Anzahl:
	1-4 kein Keimwachstum	1-4 kein Keimwachstum

Diskussion

Die Auswahl eines chirurgischen Gewebeklebers muß nach folgenden Gesichtspunkten getroffen werden:

Gewebeverträglichkeit

Abbau im Organismus

bakterizide Eigenschaften

technische Handhabung

Klebekraft.

Gewebeverträglichkeit

Die Präparate mit **K o l l a g e n g l u t i n** weisen histologisch durchwegs eine rege Knochenneubildung auf. Es zeigen sich keine pathologischen Zellelemente im Sinne von Fremdkörperriesenzellen, wie sie nach Anwendung von Cyanoacrylaten beschrieben werden. Die Möglichkeit krebssauslösender Wirkung ist somit gering. Es findet sich ein Fall von Osteoporose, welche sich auf den Trepanationsbereich beschränkt. Diese zeigt sich histologisch durch eine rarefizierte Spongiosa mit einer verminderten Anzahl von Osteoblasten am Rand der Knochenbälkchen.

O s s e i n g l u t i n erweist sich ebenfalls als eine gut gewebeverträgliche Substanz. Auch hier zeigen sich kräftige Osteoblastensäume an den frisch entwickelten Knochenbälkchen, keine exsudativen Reaktionen, keine Nekrosen. Nach 9 Wochen Untersuchungszeit kann bei sämtlichen fünf Präparaten ein vollständiger Knocheneinbau beobachtet werden. Mit Kollagen-glutin ist im Vergleich hierzu nur ein einziges Präparat ebensoweit fortgeschritten; in der Kontrollgruppe finden sich zu diesem Zeitpunkt zwei Präparate auf dem gleichen Entwicklungsstand. Das könnte bedeuten, daß Osseinglutin die Kallusbildung in einer gewissen Weise beschleunigt, während unter Kollagenglutin eine Verzögerung der Knochenneubildung stattfindet. Es liegt damit die Frage nahe, ob Kollagenglutin die Osteoidbildung der Osteoblasten verzögert. Eine Hemmung im normalen Tempo der Osteoidbildung läßt den Knochen an Substanz

verarmen, da der im Rahmen des normalen Umbaues erfolgende Abbau in der Regel ungehindert weiterläuft. Bei einem Vergleich der chemischen Eigenschaften von Kollagen- und Osseinglutin fallen der niedrige pH-Wert und der erhöhte Asche- und Sulfidgehalt von Kollagenglutin auf. Mögliche Störfaktoren bei einer Knochenneubildung? Zudem könnte durch den Prozeß der Aufbereitung des Knochens die ehemalige Fähigkeit der Kollagenfibrille, Kalziumphosphat einzulagern, - eine Grundvoraussetzung für die Entstehung von Knochen - verlorengegangen sein (Hodge, F.O. Schmitt).

Im Gegensatz zu den Polycyanoacrylaten stellt sich bei den Glutinen nicht das Problem der freiwerdenden Reaktionswärme. Der Abbindevorgang beruht hier vielmehr auf einem Sol- Gel- Übergang einer dünnflüssigen Glutininlösung zu einem Nebenvalenzmolekulargitter, welches die für die Filmbildung zunächst erforderliche Gallertfestigkeit hervorruft; zudem werden die Glutine bei einer Temperatur von 38 °C, also praktisch körpertemperatur, verarbeitet. Abbau im Organismus

Nach fünf Wochen sind bereits beide Glutinhhydrate nicht mehr nachweisbar, weder in Form von freien Klebstoffpartikeln, noch in zytoplasmatischen Einschlüssen; da sie in den bei der Herstellung histologischer Schnitte verwendeten Lösungsmitteln, Alkohol, Chloroform und Xylol, nicht löslich sind muß auf einen fermentativen Abbau geschlossen werden. Dieser geht folglich in einer relativ kurzen Zeit vor sich. Im Vergleich hierzu wird der GRF-Klebstoff nach spätestens drei Monaten resorbiert (Lemperle u. Mit.), während die Cyanoacrylate teilweise noch nach einem Jahr nachweisbar sind (Pani, Gibel). Ob Kollagenglutin und Osseinglutin jedoch die an sie gestellten Bedingungen der Platzhalterfunktion letztlich erfüllen, müßten weitere Versuchsreihen mit kürzeren Intervallen zeigen, um den frühestmöglichen Zeitpunkt des gesamten Klebstoffabbaues zu erfassen. Da sich bei einer Frakturheilung erst in der vierten bis sechsten Woche der endgültige Kallus gebildet hat, sollten die Glutinhhydrate bis mindestens kurz vor dieser Frist histologisch nachweisbar sein. Die Radioisotopendiagnostik würde sich hier als wertvolle Aussagemöglichkeit anbieten.

Bakterizide Eigenschaften

Die bakteriologischen Untersuchungen mit Glutinklebstoffen erbrachten in einem Fall, unter Anwendung von Osseinglutin, den Nachweis von Sporenbildnern. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß Glutinhhydrate eine Sporenbildung nicht verhindern können. Zur weiteren Abklärung sollten Kollagen- und Osseinglutin auf bakterieninfizierte Agarplatten gebracht werden, sodaß nach anschließender Bebrütung anhand der Breite der Hemmzonen das bakterielle Wachstum bestimmt werden kann. Bakterizide Eigenschaften sind allerdings nicht wahrscheinlich, da Glutinhhydrate reine Eiweißverbindungen darstellen. Um eine solche Wirkung zu erzielen, müßten dem Klebstoff bakterizide Substanzen zugefügt werden. Beispielsweise besitzt der Bestandteil Resorcin, ein Phenolabkömmling im GRF-Klebstoff, fungizide und bakterizide Wirkung (Lemperle u. Mit.). Die Sterilisierungsmöglichkeit für Glutinklebstoff ist begrenzt.

Temperaturen über 60 °C rufen bereits Eiweißdenaturierung hervor, und damit wiederum eine Veränderung in Viskosität und Klebefähigkeit. Aus diesem Grunde würde sich ein Sterilisieren mit ionisierenden Strahlen (Gamma-Strahlen) anbieten.

Handhabung

Die Vorbereitung der Glutinklebstoffe erfolgt in drei Schritten: Hinzufügen von Aqua dest. und Glycerin zu Kollagen- bzw. Osseinhydrat. Diese Mischung quellen, erhitzen auf maximal 60 °C und wieder abkühlen lassen auf 38 °C. Jetzt besteht eine hochvisköse Flüssigkeit, die mit einem Glasstab oder ähnlichem verarbeitet werden kann.

Ausschließlich die Cyanoacrylate können direkt mittels einer Plastikkapillare oder eines Sprays aufgetragen werden, hingegen der GRF-Klebstoff ebenfalls kurz vor Anwendung erwärmt werden muß und sodann auf die zuvor mit Formalin benetzten Wundränder aufgetragen wird. Somit erweisen sich die Acrylate in der Applikationstechnik einfach und schnell, während die Anwendung der Glutine umständlich und zeitraubend ist. Die Abbindezeit der Glutinhdratklebstoffe, welche in vitro 30 Sekunden beträgt, ist intraoperativ länger. Sie beträgt

für Kollagenglutin 50 Sekunden, für Osseinglutin 90 Sekunden. Erst nach dieser Zeit hat eine Adhäsion des Klebstoff mit dem umliegenden Gewebe stattgefunden. Im Vergleich hierzu weisen die Cyanoacrylate und der GRF-Klebstoff eine Abbindezeit von 30 Sekunden auf (Rathert/Poser). Somit entsteht bei Anwendung der Glutinhhydrate eine gewisse Verzögerung des Operationsablaufes.

Klebekraft

Die Klebekraft beider Glutinhhydrate erweist sich in vivo trotz längerer Abbindezeiten als ungenügend. Es war intraoperativ nicht möglich, eine ausreichend feste Verleimung des ausgesägten Knochenfensters zu erreichen. Das mag zum Teil daran liegen, daß derart trockene Oberflächenverhältnisse, wie sie in vitro vorliegen, in vivo nur schwer zu schaffen sind. Bereits Contzen wies darauf hin, daß die zu vereinigenden Gewebeteile möglichst trocken zu halten sind, wenn eine gute Haftung garantiert werden soll. Doch läßt sich trotz Ausräumen und Austupfen der Markhöhle ein ständiges Nachsickern von Blut oder Gewebeflüssigkeit nicht vermeiden. Glutinhhydrate saugen praktisch in ihrer Aufbereitung als Klebstoff keine Gewebeflüssigkeit auf. Die rasche, blutstillende Wirkung wie sie von reinen Kollagenimplantaten beschrieben wurde. (Bedacht), konnte nicht beobachtet werden. Hier könnte durch bindende Zusätze sicherlich eine entsprechende Verbesserung erreicht werden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden zwei neue Klebstoffe auf Gelatinebasis, ein Kollagenglutin und ein Osseinglutin, an Knochentrepanationen von Kaninchen untersucht. Es werden Kallusbildung, Gewebeverträglichkeit, Bakterizidie, Klebekraft, Abbindezeit, Sterilisationsmöglichkeit und Handhabung der Glutinklebstoffe geprüft.

Auf Grund von röntgenologischen und histologischen Befunden kann gesagt werden, daß Osseinglutin die Kallusbildung beschleunigt, Kollagenglutin hingegen eine Verzögerung verursacht. Histomorphologische Veränderungen im Sinne von Fremdkörperbildungen und Riesenzellen wurden bei keinem Präparat festgestellt. Die Möglichkeit krebsauslösender Wirkung ist daher nicht wahrscheinlich. Osseinglutin zeichnet sich durch eine besonders reizlose Gewebeverträglichkeit aus. Mit Kollagenglutin beobachten wir ein Fall von Osteoporose. Beide Klebstoffe sind nach fünf Wochen vollständig resorbiert. Mehrere Hinweise sprechen für einen fermentativen Abbau. Die Klebekraft ist allerdings bei beiden Glutinleimen nicht ausreichend. Eine belastungsstabile Frakturleimung ist aus diesem Grund nicht möglich. Bakterizide Eigenschaften bei Glutinstoffen sind nicht wahrscheinlich, da sie reine Eiweißverbindungen darstellen. Die Handhabung der Klebstoffe ist durch eine längere Zubereitung kompliziert, hier erweisen sich andere Gewebekleber als überlegen.

Insgesamt kann gesagt werden, daß die Ergebnisse bezüglich der Gewebeverträglichkeit und der Kallusbildung von Osseinglutin ermutigen, in dieser Richtung weiter zu arbeiten. Es sollten hierbei die Entwicklung stärkerer Klebekraft sowie bakterizider Eigenschaften im Vordergrund stehen.

Literaturverzeichnis

- Allgöwer M. Osteosynthese und primäre Knochenbruchheilung. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 308 (1964), 423.
- Allgöwer M., Perrén S., Ruedi Th. Biophysikalische Aspekte der normalen und der heilenden Knochenkortikalis. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 328 (1971), 109.
- Bachra B., Sobel A.E., Calcification XXV, Mineralisation of Reconstructed Collagen. Arch. Bioch. 85 (1959), 9.
- Beck H. Kunststoffklebungen mit Cyanoacrylaten an Sehnen und Knochen. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 316 (1966), 563.
- Bedacht R. - Knochenbruchbehandlung und Knochenbruchheilung. Fortschr. Med. 89 (1971), 407.
- Heterologes Kollagenimplantat im Knochen. Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen. Fortschr. Med. 89,2 (1971), 60.
- Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen über die Anwendung von heterologem Kollagenimplantat in der Knochenhöhle von Röhrenknochen. (Habilitationsschrift der Univ. München), (1969), 67.
- Bennet G.A. Bones, Pathology St. Louis, Mosby Comp. (1966), 1290.
- Benninghoff-Goerttler Lehrbuch der Anatomie Bd. 1, 9. Aufl., Urban & Schwarzenberg
- Block, W. Die normale und die gestörte Knochenbruchheilung. Neue Deutsche Chir. 62, Enke Verlag, Stuttgart, 1940.
- Bircher J., Nigst H., Erfahrungen mit Araldit im Tierexperiment. Langenbecks Arch. Klin. Chir., 304, (1963), 930.
- Bowes J., Elliott R., Moss J.A. The Composition of Collagen and Acid soluble Collagen of bovine skin. Bioch. J. 61 (1955), 735.
- Brownstein P., Wolfarth C., Matsumoto T. Tensile Strength of Isobutyl- Cyanoacrylate Tissue Adhesive. American Surgeon 37: 6 (1971)
- Bucher R., Straubmann R. Die Bedeutung der kristallinen Struktur der kollagenen Faser für die normale und pathologische Kalkpräzipitation. Schw. Med. Wschr. 67 (1937), 619
- Braunwald N.S. Gay W., Tatroles C.J. Evaluation of Crosslinked Gelatin as a Tissue Adhesive and Hemostatic Agents: an experimental study. Surgery 59, (1966), 1024 - 1030.

- Carstensen G. Eine neue Methode der Gefäßkonservierung durch Einbettung in einen schnellhärtenden Kunststoff Chir. 31, 49 (1960)
- Chvapil M., Holusa R. Experiences with the Collagen Sponge as Hemostaticum and Tampon. J. Biomed. Mater. Res. Vol. 2, (1968), 245
- Chvapil M., Krajicek M. Die Analyse einiger theoretischer Probleme bei der Verwendung von Erzeugnissen aus Kollagen in der Medizin. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 318 (1976), 80.
- Contzen H.
- Begründete Anwendungsmöglichkeiten für klebende Autopolymerisate. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 316 (1966), 560.
 - Der derzeitige Stand der Gewebevereinerung durch klebende Autopolymerisate. Med. Mitt. Melsungen 42 (1968), 7.
 - Materialtechnische Voraussetzungen und biologische Gewebereaktion bei Implantation von Kunststoffen. Bruns. Beiträge Klin. Chir. 204 (1962), 179 - 190
- Cooper G.W.,
Prockop D.J. Intracellular Accumulation of Collagen by embryonic Cartilage Cell., J. Cell. Biolog. 38 (1968), 523
- Danckwardt-Lillieström G. Intramedullary nailing after Reaming. An
Lorenzi G.L., Olernd S. Investigation on the Healing process in osteotomized rabbit tibias. Acta Orthop. Scand. Suppl. 134 (1970)
- Dulce H.J. Zur Biochemie der Verknöcherung. 1. Mineralgehalt des hyalinen Knorpels und Knochen. Hoppe-Seyler's Z. Physiolog. Chem. 319 (1960), 257.
- Dürr W. Knochenzement und Frakturheilung. Hefte Unfallheilkunde 107, 255.
- Faul P. Untersuchungen zum Ersatz der Chir. Naht durch Kleben (Butylcyanoacrylat). Med. Diss. München 1966
- Flamagan B., Nichols J. Metabolic Studies of human bone in vitro. 1. normal bone. J. Clin. Invest. 44, (1965), 276.

- Fleisch H. - Physiologie und Biochemie der Knochenbildung. Klin. Wschr. 44 (1966), 360.
- Neue Gesichtspunkte der Kalkablagerung. Schw. Med. Wschr. 91 (1961), 858.
- Friedenberg zit. b. Willenegger
- Geiser M. Zur Pathophysiologie der Frakturheilung. Eine exp. Studie an der Kaninchentibia. Arch. Orthop. Unfallchir. 51 (1959), 201.
- Gibel W., Gumel H. Über die gegenwärtigen Möglichkeiten einer Anwendung von Klebstoffen in der Chirurgie. Dt. Gesundheitswesen 23 (1968), 577.
- Gottlob R., Blümel G., Pigisch E. Erfahrungen mit der Klebstoffanostomose und vergleichende Untersuchungen über die Toxizität eines GRF-Klebers und eines Cyanoacrylates. Kunststoffe in der Chir., Symposium Innsbruck, Februar 1969, S. 149
- Gottlob R., Blümel G., Über Gefäßwandveränderungen nach Einwirken von Alkylcyanoacrylatklebern. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 317 (1967), 1960.
- Hamit H. Comparative Study of Cyanoacrylate and Cross-linked Gelatin Compound in Hemostatis of Antikoagulated Wound. Military Medicinel 34, Nr. 2, (1969), 98.
- Häring R. Klebstoff als Nahtersatz in der Chirurgie. Fortschr. Med. 86 (1968), 179 - 182
- Häring R. et. al. Untersuchungen über die Resorption von Gewebeklebstoffen. Z. Exp. Chir. 6,2 (1973), 108 - 114
- Die Verklebung von Hautwunden nach Verletzungen. Med. Klin. 64 (1969), 1240 - 1244
- Hedri A. Ein neues Prinzip in der Osteosynthese. Arch. Klin. Chir. 167 (1931), 145.
- Heiss W. Gewebeklebstoffe. Applikation, Eigenschaften, Anwendungsmöglichkeiten. Med. Mitt. Mels. 42, (1968), 11
- Heiss W., Daum R., Zur Blutstillung an parenchymatösen Organen durch Gewebeklebstoff. Pädiatr. Praxis 10 (1971), 605.

- Heiss W., Faul P.,
Pichlmeier H. Nahtlose Testhautverpflanzung mit einem neuartigen Gewebeklebstoff. Z. Immunitätsforschung 129 (1965), 288.
- Heiss W., Guthy E.
Becker E. Experimentelle Untersuchungen zum Ersatz der chir. Naht durch Klebstoff. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 308 (1964), 793
- Heiss W., Guthy E.,
Faul P., Vergleichende Untersuchungen zur Reißfestigkeit mit Klebstoff verschlossener Wunden. Symposium Klebstoffe in der Chir., Wien, Med. Akad. Wien 1967, (Vortrag).
- Hellner H., Nissen R.,
Vosschulte K. Frakturen und Luxationen. Lehrbuch der Chir. Thieme Verl. Stuttgart 1970, 766.
- Herrmann K., Die therapeutischen Ergebnisse zweier Fälle mit Kunststoffbehandlung von Frakturen des wachsenden Knochens. Zbl. Chir. 88 (1963), 1258.
- Herrmann L. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frakturheilung bei unterschiedlichem Behandlungsmodus. Acta Biol. Med. Ger. 20 (1968), 845.
- Hodge A.J., Schmitt F.D. Das Tropokollagen- und Makromolekül und die Eigenschaften seiner geordneten Aggregationsformen. Leder 11 (1960), 74.
- Hörmann H. Zur Frage der Quervernetzung von Kollagen. Leder 13 (1960), 79.
- Hövels D. Stoffwechsel des Knochens. In: Schmidt-Opitz, Handbuch der Kinderheilkunde, Bd. 6, Springer Verlag Heidelberg 1970.
- Hulliger L. Untersuchungen über die Wirkung von Kunstharzen- Palacos und Ostamer- in Gewebekulturen. Arch. Orthop. Unfallchir. 54 (1962), 581
- Kaiser E., Stockinger L. Morphologie und Biochemie des Bindegewebes. Mchn. Med. Wschr. 113 (1971), 321
- Karlson P. Lehrbuch der Biochemie. Thieme Verl. Stuttgart 6. Aufl.
- Kettler L.H. Lehrbuch der speziellen Pathologie. G. Fischer Verlag, Jena, 2. Aufl.
- Köhnlein H.E. Experimentelle Testung von Kollagenfilm an Notverbänden. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 316 (1966), 580.

- Kühn K. Über den Ursprung des Querstreifungsmusters bei Kollagen. Leder 11 (1960), 110.
- Kühn K., Zimmerer E., Eigenschaften des Tropokollagenmoleküls und die Bedeutung für die Fibrillenbildung. Z. Naturforschung 16 b (1961), 648
- Küntscher G. Das Kallusproblem. Enke Verlag, Stuttgart 1970
- Lane zit. b. Willenegger
- Leemann R.A., Jenny M. Tierexperimentelle Erfahrungen mit Ostamer zur Frakturleimung. Helv. Chir. Acta 31 (1961) 484
- Lemperle G., Köhnlein H., Tierexperimentelle Untersuchungen mit einem neuen Gelatine- Resorsin- Formaldehyd-Klebstoff. Klebstoffe in der Chirurgie. Internat. Symposium Wien 1967, Verl. Wiener Akademie, Wien, 1968, S. 21.
- Leonhardt H., Histologie und Cytologie des Menschen. Thieme Verlag Stuttgart 1967.
- Lick R., Brückner W., Zum nahtlosen Wundverschluß durch Kleben. Histomorphologische Befunde. Med. Klin. 62, Dietrich K. (1967), 321
- Lick R., Brückner W., Tierexperimentelle Untersuchungen zum Problem der Wundheilung nach Anwendung von Methyl-2-cyanoacrylat. Langenbecks Arch. Klin. Schreiner L. Chir. 313, (1965), 699 - 704.
- Lighterman J., Farral J. Treatment of experimentally induced mandibular fractures with plastic polymer. Surg. Forum 13 (1963), 466
- Mandarino M.P. The Use of polyurethane polymer (Ostamer) in fractured and diseased bone. Surg. Clin. Amer. 40 (1960), 243
- Matsumoto T. et. al. Tissue adhesives and wound healing. Observation of wound healing by microscopy and microangiography. Arch. Surg. 98 (1969), 266 - 271
- Disposable aerosol tissue adhesive spray. Arch. Surg. 95, (1967), 685 - 688
- Long-term study of aerosol cyanoacrylate tissue adhesive spray: Carcinogenicity and other untoward effects. Amer. Surg. 35 (1969), 825 - 827

- Mc Lean F.C., Urist M.R. Bone. Introduction to the physiology of skeletal tissue. Chicago University Press 1961
- Müller M.E. Ostamer und Palakos in der Knochenchirurgie. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 304 (1963) 934
- Müller M.E., Allgöwer M., Willenegger H. Technik der operativen Knochenbruchbehandlung. Springer Verl. Heidelberg 1963
- Neuberger A., Perron J.C. The relativ metabolic inertia of tendon collagen in the rat. Biochem. J. 49 (1951), 199
- Nigst H., Wagener H., Bircher J., Zuppinger P. Industrielle Gießharze in der Knochenchirurgie. Dtsch. Med. Wschr. 85 (1960), 658
- Olsson S.T., Rietz K. Polymer osteosynthesis. An experimental study with methyl-2-cyanoacrylate in bone grafting. Acta Chir. Scand. Suppl. 367 (1966)
- Ott G. Fremdkörpersarkome. Springer Verl. 1970
- Page et.al. Chronic toxicity. Studies of methyl-2-cyanoacrylate in dogs and rats. Phys. adhesives 1966, S. 11 - 23
- Pani K., Gladioux G., Kulkarni R., Leonhardt F. The degradation of butyl-2-alphacyanoacrylate tissue adhesives. Surgery 63, (1968), 481
- Pigisch E., Gottlob R., Vergleichende Untersuchungen zur Histotoxizität eines Butyl-2-cyanoacrylates und eines GRF-Klebers. Z. Exp. Chir. (1970), 243
- Rahn B., Gallinaro P. et.al. Primary bone healing. An experimental study in the rabbit. J. Bone Jt. Surg. Am. June 1971
- Rathert P., Poser W. Gewebeklebstoffe in der Medizin. Goldmann Verlag 1972
- Reich G. Kollagen. Steinkopf Verl. Dresden 1966
- Reifferscheid M. Chirurgie. Kurz gefaßtes Lehrbuch, Thieme Verl. Stuttgart 1970
- Sandritter W. Histopathologie. Schattauer Verl. Stgt. 1968
- Schenk R., Willenegger H. Zum histologischen Bild der sog. Primärheilung der Knochenkompakta nach experimentellen Osteotomien am Hund. Experienta 19 (1963), 593

- Scheuba G. Die Osteosynthese mit dem Kunstharz Palakos. Chirug 37 (1966), 506
- Schönbach G. Verzögerte Knochenbruchheilung nach Klebung. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 316 (1966), 572
- Schwaiger L. Traumatologie. Thieme Verl. 1971
- Struck H., Hernandes-Richter J., Heinrich S. Die Beeinflussung der Wundheilung durch Kollagen. Serologische Aspekte und ihre Bedeutung für die Klinik. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 316 (1966), 577.
- Uehlinger E., Puls P. Funktionelle Anpassung des Knochen auf physiologische und unphysiologische Beanspruchung. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 319 (1967), 362
- Verzar F. Das Altern des Kollagens. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 14 (1956), 207
- Vitali H.P. Die biologischen Grundlagen der Knochen-
transplantation. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 99, (1965), 146
- Wallraff J. Leitfaden der Histologie des Menschen. Urban & Schwarzenberg Verl. Mchn. 1967, 58
- Wanke H. Kollagenschaumfolie als temporärer Hautersatz. Mschr. Unfallheilk. 69 (1966), 501
- Willenegger H., Perren S. Knochenregeneration und -Transplantation
Schenk R. Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung. Chirug 42, (1971), 241
- Willenegger H., Schenk R. Die Anwendung von Leimschubstanzen in der
Bandi W. Knochenchirurgie. Med. Mitt. Melsungen 37 (1963), 2487
- Woodward S.C., Herrmann J.B., Cameron J. et.al. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesive in the rat. Ann. Surg. 162 (1965), 113
- Zingg W. Zur Frakturbehandlung mit Knochenleim. Schweiz. Med. Wschr. 90 (1960), 1016

Danksagung

Es bleibt mir die Aufgabe für die Überlassung des Themas Herrn Prof. Bedacht zu danken, ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Schweiberer, Direktor der Chirurgischen Klinik München, und seinem Oberarzt Herrn Dr. med. Eittel für ihre Unterstützung und die Möglichkeit an dieser Klinik experimentell zu arbeiten. Herr Prof. Dietl vom Polytechnikum München stellte uns die Glutinklebstoffe zur Verfügung und half uns unermüdlich bei der Klärstellung der Probleme seines Fachgebietes. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank. Herr Prof. Prechtel half uns bei der Beurteilung der histologischen Präparate. Schließlich sei all jenen Mitarbeitern der Klinik, die für die Herstellung der histologischen Schnitte, der bakteriologischen Untersuchungen und für die Betreuung der Versuchstiere verantwortlich waren, für ihre freundliche Zusammenarbeit aufrichtig gedankt.

Lebenslauf

Als Tochter des Apothekers Hans- Heinz Piechulek und seiner Frau Ilse, geb. Weise, wurde ich am 5.6.1940 in Breslau geboren. Nach der Übersiedelung 1945 nach Bayern Besuch der Volksschule in Neu- Ulm, der Oberrealschule in Ulm mit Abiturabschluß 1960.

Pharmazeut. Vorexamen in Augsburg 1962. Mehrjährige Tätigkeit als Vorexamierte. Medizinstudium in München mit Staatsexamen 1975.

Medizinalassistentenzeit am Städt.Krankenhaus München-Schwabing und an der Universitätshautklinik in München. Ausbildung zur Allgemeinärztin am Städt. Krankenhaus Kaufbeuren und am Kreiskrankenhaus Füssen. Übernahme einer Allgemeinarztpraxis 1983 in Marktoberdorf/ Allgäu.

1983 Eheschließung mit Herrn Reinhard von Tümpling.

Marktoberdorf, den 4.11.1984

DECLARATION

I, the undersigned, do hereby declare that the foregoing is a true and correct copy of the original as the same appears in the records of the Court of the County of [] State of []

Witness my hand and seal of office this [] day of [] 19[]

Notary Public for the State of []

Notary Public, my []

